



TITLE:

The intracellular Ca^{2+} concentration is elevated in cardiomyocytes differentiated from hiPSCs derived from a Duchenne muscular dystrophy patient(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tsurumi, Fumitoshi

CITATION:

Tsurumi, Fumitoshi. The intracellular Ca^{2+} concentration is elevated in cardiomyocytes differentiated from hiPSCs derived from a Duchenne muscular dystrophy patient. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-05-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13354>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏 名	鶴 見 文 俊
論文題目	The intracellular Ca ²⁺ concentration is elevated in cardiomyocytes differentiated from hiPSCs derived from a Duchenne muscular dystrophy patient (デュシェンヌ型筋ジストロフィー疾患特異的 iPS 細胞由来分化心筋細胞における細胞内カルシウムイオン濃度上昇)		
(論文内容の要旨)			
<p>デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、細胞骨格成分の一部であるジストロフィンが欠損することにより進行性の筋萎縮を起こす疾患で、筋ジストロフィーの中で最も多く最重症型である。筋線維の破壊・変性と再生を繰り返しながら筋萎縮と筋力低下が進行し、一般的には 10 歳前後で歩行困難となり、10 代後半～20 歳前後で呼吸筋力低下や心不全を来す。近年の経鼻型陽圧呼吸器や気管切開を介した在宅呼吸器などの呼吸補助器機の進歩により、呼吸不全による死亡は劇的に減少した。それに伴い、 DMD 患者の死亡原因の主は心不全に陥る心筋症に取って代わった。心筋症発症の前段階である無症候性の心筋症（肥大型心筋症や拡張型心筋症）は、心エコーなどの精査において 6 歳までの患児の 25%、6～10 歳で 59%に認めると報告されている。DMD 患者において骨格筋障害が起こる機序は、ジストロフィンが細胞骨格タンパクであるため、従来、細胞膜脆弱性とされてきた。しかしながら近年、疾患モデルマウスである mdx マウスの知見から、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が関与していると考えられてきている。一方、DMD 患者で心筋症が発症・進行するメカニズムは未だはっきりしていない。これを検討するために、ヒト人工多能性幹細胞(hiPS 細胞)から分化させた心筋細胞を用いて、in vitro において細胞内カルシウムイオン濃度と濃度変化（カルシウムトランジェント）を調べた。本研究に使用した hiPS 細胞は、ジストロフィン遺伝子のエクソン 44 に欠失のある DMD 患者と変異を持たない疾患既往歴のない両親から作製した。 いずれの hiPS 細胞から分化させた心筋細胞も、免疫染色において心筋トロポニン T を発現しており成熟心筋が in vitro で作製できていると判断できた。DMD 患者由来 hiPS 細胞からの分化心筋細胞においては、免疫染色上 ジストロフィンの発現を認めず、DMD に特徴的な心筋細胞が作製可能であった。次に骨格筋細胞障害の原因の一つと報告がある細胞内カルシウム代謝に注目して研究を進めた。細胞内カルシウムイオン濃度とカルシウムトランジェントは、蛍光指示薬である Indo-1 の 2 波長蛍光強度比(410nm/490 nm)を用いて測定した。測定の結果、静止値(R0)、ピーク値(Rmax)、及びその差となる振幅(Rmax-R0)のいずれにおいても、DMD 患者由来 hiPS 細胞から分化させた心筋細胞では、コントロール hiPS 細胞から分化させた心筋細胞と比べて、蛍光強度比の有意な上昇がみられた。この結果から DMD 患者由来心筋細胞は通常状態においても細胞内カルシウム濃度が高く細胞障害を起こしうるストレスに晒されていることが判明した。さらに培養細胞伸展システムを用いて分化心筋細胞に機械的な伸展刺激を加えると、DMD 患者由来 hiPS 細胞から分化させた心筋細胞においては、静止値(R0)及びピーク値(Rmax)での細胞内カルシウムイオン濃度が有意に上昇したが、コントロールの hiPS 細胞から分化させた心筋細胞ではいずれの変化も認めなかった。静止値(R0)の上昇は、収縮期に放出されたカルシウムイオンが細胞内の小胞体に十分に再取り込みされていない、すなわち心筋細胞の拡張機能が障害されていると考えられた。以上より、DMD 患者の心筋症発症・進展機序の一つは、安静時やストレス時の細胞内カルシウムイオン濃度の異常上昇が関与していると結論づけた。</p>			

<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>本研究は筋ジストロフィーの中で最多、最重症であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)において、心筋症が発症・進行するメカニズムについて検討したものである。DMD 患者から作製した疾患特異的ヒト人工多能性幹細胞(hiPS 細胞)から分化させた心筋細胞を用いて、細胞内カルシウムイオン(Ca²⁺)濃度と濃度変化（カルシウムトランジェント）を細胞内カルシウム指示薬 Indo-1 で測定したところ、静止値(R₀)、ピーク値(Rmax)のいずれにおいても、DMD 患者由来 hiPS 細胞から分化させた心筋細胞では、コントロール hiPS 細胞から分化させた心筋細胞と比べて、細胞内 Ca²⁺濃度の有意な上昇がみられた。さらに、培養細胞伸展システムを用いて分化心筋細胞に伸展刺激を加えると、DMD 患者由来 hiPS 細胞から分化させた心筋細胞では、静止値(R₀)、ピーク値(Rmax)のいずれにおいても細胞内 Ca²⁺濃度が有意に上昇したが、コントロール hiPS 細胞から分化させた心筋細胞では変化を認めなかった。これらの結果から DMD 患者由来心筋細胞は安静時通常状態においても細胞内 Ca²⁺濃度が高く細胞障害を起こしうるカルシウム過負荷に晒されており、さらにそれは伸展刺激で増強することが示された。</p> <p>以上の研究は、DMD において、心筋症が発症・進展する機序の解明に貢献し、治療介入時期の検討や新たな治療戦略の考案に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 3 月 1 0 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			